

FISH AND CHIPS

P. DELVENNE (1), M. DEPREZ (2), B. BISIG (3), M. JAMAR (4), J. BONIVER (5), V. BOURS (6), CH. HERENS (7)

RÉSUMÉ : Un laboratoire hospitalier universitaire se doit d'offrir aux patients la possibilité d'avoir un diagnostic le plus précis possible via le développement de nouvelles analyses. C'est le cas notamment des techniques de biologie moléculaire comme l'hybridation *in situ* fluorescente (FISH; Fluorescent In Situ Hybridization) et les chips (biopuces; microdamiers, ...). Le but de cet article est de faire le point sur les principes et applications potentielles de ces techniques.

MOTS-CLÉS : *Hybridation in situ fluorescente - Biopuces - Microdamiers - Pathologie - Génétique - Biologie moléculaire*

FISH AND CHIPS

SUMMARY : Academic hospital laboratories should offer patients the possibility to have the most accurate diagnosis by the development of new analyses, such as molecular biology tests including FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) and chips (microarrays,...). The purpose of this article is to describe the principles and the potential applications of these techniques.

KEYWORDS : *Fluorescent In Situ Hybridization - Chips - Microarray - Pathology - Genetics - Molecular Biology*

INTRODUCTION

L'anatomie pathologique est la discipline médicale qui étudie les lésions provoquées par les maladies sur les organes, les tissus ou les cellules, en utilisant des techniques principalement fondées sur l'examen macroscopique et microscopique. Cependant, des tissus ou des cellules similaires morphologiquement peuvent être très différents (origine, comportement, ...).

L'examen morphologique des prélèvements cellulaires et tissulaires peut être complété par des analyses utilisant de nouvelles techniques, comme l'hybridation *in situ* fluorescente (FISH: Fluorescent In Situ Hybridization) et les chips (biopuces; microdamiers, ...).

La technique de FISH est couramment utilisée en génétique (cytogénétique moléculaire), car elle apporte des informations complémentaires à l'étude du caryotype (cytogénétique conventionnelle ou standard). Elle permet notamment la caractérisation de remaniements chromosomiques complexes (impliquant plusieurs chromosomes), cryptiques (non détectables au caryotype) ou responsables de fusions ou d'amplifications géniques. Elle rend possible également la détection d'aberrations chromosomiques sur noyaux entiers (cytogénétique interphasique), par exemple en cas d'échec d'obtention de mitoses pour la réalisation du caryotype.

Les développements de la biologie moléculaire, de la biotechnologie miniaturisée et de la bio-informatique apportent aujourd'hui de nouveaux espoirs avec l'utilisation des chips. Grâce à cette technique, il est possible d'analyser simultanément, dans des échantillons biologiques, le nombre de copies ou l'expression d'un grand nombre de gènes d'intérêt connu ou potentiel. Ces techniques ont déjà fait la preuve de leur grande efficacité en recherche fondamentale. Elles sont aussi appliquées de plus en plus pour l'analyse des tumeurs humaines.

Dans la suite de cet article, sont décrits les principes méthodologiques généraux et les pathologies qui bénéficient actuellement du développement des techniques de FISH et de chips.

FISH

PRINCIPES GÉNÉRAUX

L'hybridation *in situ* fluorescente (FISH) est réalisée au sein de l'Unilab Lg du CHU de Liège, en étroite collaboration entre les services d'Anatomie pathologique et de Génétique humaine. Elle peut se faire sur des suspensions cellulaires, des empreintes, des coupes congelées ou déparaffinées. Elle permet d'identifier dans chaque cellule la présence et le nombre de copies d'un segment chromosomique donné. L'utilisation simultanée de plusieurs fluorochromes différents permet d'évaluer le statut de plusieurs loci génétiques ou de mettre en évidence des réarrangements chromosomiques récurrents de leucémies ou tumeurs (colocalisation).

(1) Professeur, (2) Chargé de Cours, (3) Aspirante-Spécialiste, (5) Professeur ordinaire honoraire, Service d'Anatomie Pathologique, CHU de Liège.

(4) Chef de Laboratoire, (6) Professeur ordinaire, (7) Attaché scientifique, Service de Génétique Humaine, CHU de Liège.

Le principe de la FISH repose sur des homologies de séquence d'acides nucléiques permettant l'identification spécifique de tout ou partie d'un ou de plusieurs chromosomes. Une séquence d'ADN marquée par un fluorochrome (appelée sonde) est utilisée. Elle s'hybride aux séquences complémentaires de l'ADN étudié (cible).

La technique comprend plusieurs étapes :

- une étape de digestion protéolytique permettant une meilleure pénétration de la sonde dans le noyau;
- une étape de dénaturation de l'ADN de la sonde et de l'ADN cible qui consiste à séparer (généralement par la chaleur) les deux brins d'ADN par rupture des liaisons hydrogènes;
- une étape d'hybridation durant laquelle les brins d'ADN se réassocient de façon spécifique, ce qui permet à l'ADN sonde de s'hybrider à l'ADN cible;
- une étape de lavage qui permet d'éliminer les hybrides infidèles et les sondes non hybridées;
- une étape de contre-coloration de l'ADN cible, de stabilisation de la fluorescence et de montage des lames;
- enfin, une étape de lecture et d'interprétation au microscope.

APPLICATIONS

La FISH est de plus en plus utilisée pour rechercher des anomalies chromosomiques variées (polysomie, monosomie) ou géniques (délétion ou amplification de certains gènes, translocation), anomalies qui peuvent avoir dans certaines tumeurs une valeur diagnostique, pronostique ou prédictive d'une réponse thérapeutique.

Les cancers qui bénéficient actuellement de la mise en évidence, par cette technique, d'anomalies génétiques spécifiques sont les néoplasies du système hématologique, des tissus mous, du système nerveux central et de différents cancers solides comme l'adénocarcinome mammaire.

NÉOPLASIES DU SYSTÈME HÉMATOLOGIQUE

Les tumeurs des tissus hématopoïétiques et lymphoïdes englobent une grande variété d'entités, importantes à distinguer les unes des autres en raison de pronostics et traitements très différents. La démarche diagnostique en hématopathologie, basée sur la classification de l'OMS, utilise une approche multiparamétrique qui vise à incorporer les résultats des analyses génétiques dans les observations morphologiques et immunophénotypiques (1). Une collaboration étroite entre les services d'Anatomie pathologique et

de Génétique humaine est donc primordiale pour parvenir à un diagnostic intégré.

Plusieurs anomalies génétiques récurrentes ont été décrites dans les hémopathies malignes. La plupart intéressent des translocations chromosomiques, impliquées dans la pathogenèse de ces cancers, suivant l'un de ces deux mécanismes : (i) par fusion de deux gènes (une protéine-chimère est créée ayant une activité oncogénique; exemple : translocation t(2;5)(p23;q35) produisant la protéine-chimère NPM-ALK ayant une activité tyrosine kinase constitutive); (ii) par dérégulation transcriptionnelle (un oncogène est placé sous le contrôle du promoteur d'un autre gène et est ainsi surexprimé; exemple : translocation t(8;14)(q24;q32) juxtaposant le promoteur du locus de la chaîne lourde des immunoglobulines (IGH) et l'oncogène c-MYC, entraînant la surexpression de ce dernier).

En raison de l'association plus ou moins spécifique de certaines translocations avec des entités tumorales, leur détection peut contribuer au diagnostic, ou conférer une signification pronostique et/ou prédictive d'une réponse à un traitement. A titre d'exemple, le Tableau I reprend les principales translocations chromosomiques récurrentes dans les lymphomes non hodgkiniens et indique leur signification clinico-pathologique (1). Dans beaucoup de cas, l'oncoprotéine surexprimée peut être détectée par immunohistochimie. Les anomalies chromosomiques peuvent être détectées soit par l'analyse cytogénétique conventionnelle (caryotype) lorsque du tissu frais est disponible, soit par l'analyse de FISH, pouvant être réalisée sur du tissu fixé. Ces analyses complètent les données anatomopathologiques pour l'établissement d'un diagnostic final.

Les sondes FISH utilisées pour détecter les translocations sont principalement de deux types: les sondes de séparation (break-apart FISH probes) et les sondes de double fusion (dual fusion FISH probes) (2). Le principe de leur fonctionnement est illustré dans la Figure 1A-D. Lorsque les deux partenaires d'une translocation sont connus, celle-ci peut être recherchée par des sondes de double fusion. Lorsque l'un des partenaires d'une translocation est inconnu ou lorsqu'il existe plusieurs partenaires possibles, on utilise des sondes de séparation.

NÉOPLASIES DES TISSUS MOUS

En pratique clinique, le diagnostic de différents types de tumeurs des tissus mous bénéficie de la mise en évidence d'anomalies génétiques spécifiques par FISH. Celle-ci peut s'avérer

TABLEAU I. PRINCIPALES TRANSLOCATIONS CHROMOSOMIQUES RÉCURRENTES ASSOCIÉES AUX LYMPHOMES

Sous-type de lymphome	Translocations récurrentes les plus fréquentes	Gènes impliqués	Prévalence des translocations	Valeur clinico-pathologique des translocations
Lymphome folliculaire	t(14;18)(q32;q21) t(3;)(q27;)	<i>IGH/BCL2</i> <i>BCL6/variable</i>	80% 15%	Marqueurs diagnostiques
Lymphome de la zone marginale de type MALT	t(11;18)(q21;q21)	<i>API2/MALT1</i>	10-35%	Marqueur diagnostique et prédictif (résistance au traitement d'éradication d'H. pylori)
	t(14;18)(q32;q21) t(1;14)(p22;q32)	<i>IGH/MALT1</i> <i>BCL10/IGH</i>	5-10% <5%	Marqueurs diagnostiques
Lymphome du manteau	t(11;14)(q13;q32)	<i>CCND1/IGH</i>	95%	Marqueur diagnostique
Lymphome diffus à grandes cellules B	t(3;)(q27;) t(14;18)(q32;q21) t(8;)(q24;)	<i>BCL6/variable</i> <i>IGH/BCL2</i> <i>MYC/variable</i>	30% 20-30% 10%	Marqueurs diagnostiques et pronostiques
Lymphome de Burkitt	t(8;14)(q24;q32) t(2;8)(p12;q24) t(8;22)(q24;q11)	<i>MYC/IGH</i> <i>IGK/MYC</i> <i>MYC/IGL</i>	90-100%	Marqueurs diagnostiques
Lymphome anaplasique à grandes cellules	t(2;5)(p23;q35) t(2;)(p23;)	<i>ALK/NPM</i> <i>ALK/autres</i>	50-70% 10-15%	Marqueurs diagnostiques et pronostiques

indispensable, car le diagnostic des tumeurs des tissus mous reste difficile. Certaines d'entre elles font partie du groupe des tumeurs à petites cellules rondes qui peuvent être très difficiles, voire impossibles à distinguer. Ce groupe comprend le sarcome d'Ewing/PNET, la tumeur desmoplasique à petites cellules rondes, le rhabdomyosarcome alvéolaire, le chondrosarcome mésoenchymateux et le neuroblastome. À l'exception du chondrosarcome mésoenchymateux et du neuroblastome, ces tumeurs sont caractérisées par des translocations réciproques qui sont spécifiques de chaque entité et qui peuvent être mises en évidence par FISH (3-5) (Tableau II). Cependant, un même gène peut non seulement avoir de multiples partenaires, mais aussi être réarrangé dans différents types tumoraux. C'est le cas notamment pour le gène EWS (Ewing Sarcoma), connu pour avoir au moins 7 partenaires différents dans les sarcomes d'Ewing/PNET et être le gène cible dans les sarcomes d'Ewing et dans les tumeurs desmoplasiques à petites cellules rondes notamment.

La stratégie de la FISH repose, comme pour les néoplasies hématologiques, sur l'utilisation de sondes de séparation (break-apart) formées de deux sondes couplées à des fluorochromes différents (vert et rouge) et situées de part et d'autre du gène d'intérêt (Fig. 1A-B). Cette approche a le grand avantage d'identifier un réarrangement du gène quel que soit le partenaire de la trans-

location. Elle a cependant le défaut de ne pas identifier le partenaire et, donc, parfois le type histologique de la tumeur. Cet inconvénient peut être effacé par l'utilisation de sondes de fusion (ciblant les 2 gènes partenaires de la translocation; Fig. 1C-D), mais elles ne sont pas toutes disponibles à l'heure actuelle.

Les sarcomes pour lesquels les recherches d'anomalies génétiques sont les plus fréquentes sont le sarcome synovial, le sarcome d'Ewing/PNET, le rhabdomyosarcome alvéolaire, le sarcome à cellules claires et les liposarcomes bien différenciés ou dédifférenciés, myxoïdes ou à cellules rondes. Ces recherches s'avéreront à l'avenir de plus en plus indispensables pour arriver à un diagnostic précis d'autant que les traitements seront de plus en plus adaptés aux types de tumeurs, définis en partie sur la base des anomalies génétiques associées.

NÉOPLASIES DU SYSTÈME NERVEUX CENTRAL

Les astrocytomes, oligodendrogliomes et oligo-astrocytomes sont les types histologiques les plus fréquents de gliomes chez l'adulte. La distinction entre ces différents types histologiques peut être difficile sur la base des seules caractéristiques morphologiques. Des altérations génétiques spécifiques sont associées à certains de ces types histologiques (6, 7) et peuvent être recherchées par la technique de FISH. De plus,

TABLEAU II. RÉARRANGEMENTS CHROMOSOMIQUES ET MOLÉCULAIRES RÉCURRENTS DES TUMEURS DES TISSUS MOUS

Histologie	Anomalies chromosomiques	Gènes de fusion	Prévalence
Sarcome d'Ewing/PNET	t(11;22)(q24;q12) t(21;22)(q22;q12) t(7;22)(p22;q12) t(17;22)(q12;q12) t(2;22)(q33;q12) t(1;22)(p36;q12) t(16;21)(p11;q22)	<i>EWSR1-FLI1</i> <i>EWSR1-ERG</i> <i>EWSR1-ETV1</i> <i>EWSR1-ETV4</i> <i>EWSR1-FEV</i> <i>EWSR1-ZSG</i> <i>FUS-ERG</i>	85-95 % 5-10 % < 1 % < 1 % < 1 % < 1 % < 1 %
Sarcome synovial	t(X;18)(p11;q11)	<i>SS18-SSX1</i> <i>SS18-SSX2</i> <i>SS18-SSX4</i>	65 % 35 % rare
Tumeur desmoplasique à petites cellules rondes	t(11;22)(p13;q12)	<i>WT1-EWSR1</i>	> 80 %
Rhabdomyosarcome alvéolaire	t(2;13)(q35;q14) t(1;13)(p36;q14) t(X;2)(q13;q35) t(2;2)(q35;p23)	<i>PAX3-FOXO1A</i> <i>PAX7-FOXO1A</i> <i>PAX3-AFX</i> <i>PAX3-NCOA1</i>	70 % 10-15 % rare rare
Liposarcome myxoïde (et liposarcome à cellules rondes)	t(12;16)(q13;p11) t(12;22)(q13;q12)	<i>FUS-DDIT3</i> <i>EWSR1-DDIT3</i>	90 % rare
Sarcome à cellules claires	t(12;22)(q13;q12) t(2;22)(q32.3;q12)	<i>ATF1-EWSR1</i> <i>CREB1-EWSR1</i>	90 % rare
Chondrosarcome myxoïde extrasquelettique	t(9;22)(q22;q12) t(9;17)(q22;q11) t(9;15)(q22;q21)	<i>EWSR1-NR4A3</i> <i>RBP56-NR4A3</i> <i>TCF12-NR4A3</i>	75 % 25 % rare
Sarcome fibromyxoïde de bas grade	t(7;16)(q32-34;p11) t(11;16)(p11;p11)	<i>FUS-CREB3L2</i> <i>FUS-CREB3L1</i>	95 % 10 %

ces altérations génétiques sont aussi intéressantes pour prédire le pronostic des patients (en termes de survie), ainsi que leur réponse au traitement combiné par la chimio- et la radiothérapie qui complète le traitement chirurgical, et ce quelle que soit la morphologie de la tumeur (8).

En particulier, les délétions du bras court de chromosome 1 (1p) et du bras long du chromosome 19 (19q) sont très souvent retrouvées dans les oligodendrogliomes (6, 7, 9). Environ 70%, 50% et 50% des tumeurs à morphologie oligodendrogliale ont des délétions respectivement de 19q, 1p et à la fois de 19q et 1p. Par contre, la délétion combinée des régions 1p et 19q est rare dans les gliomes de type astrocytaire. Dès lors, la présence d'une délétion combinée 1p/19q est hautement suggestive d'un oligodendrogliome ou d'un gliome mixte à composante oligodendrogliale. Les trisomies 7 et 19, ainsi que les monosomies 10, sont par contre plutôt retrouvées dans les gliomes de dérivation astrogliale (10).

Ces mêmes délétions de 1p seul, ou de 1p et 19q en combinaison, ont été associées à une bonne réponse à différents schémas de chimio-

thérapie et radiothérapie (8). Cette association a été particulièrement bien démontrée dans le cas des oligodendrogliomes de haut grade (oligodendrogliomes anaplasiques) (11).

ADÉNOCARCINOME MAMMAIRE

Le statut HER2 dans les adénocarcinomes mammaires a une importance clinique primordiale. En effet, il possède une grande valeur pronostique, mais également prédictive. Il permet en particulier non seulement de sélectionner les patientes pouvant retirer un bénéfice d'un traitement ciblant HER2, mais aussi de prédire une résistance relative au traitement hormonal. De plus, un statut HER2 positif est associé à un mauvais pronostic qui se traduit par un taux augmenté de récidives et une mortalité plus élevée. C'est la raison pour laquelle des recommandations internationales (12) et belges (13) ont été publiées pour réaliser les tests HER2.

Brièvement, un échantillon représentatif d'une tumeur invasive du sein fixé au formol et enchâssé en paraffine fait d'abord l'objet d'une analyse immunohistologique pour HER2. Lorsque le score immunohistologique est 0 ou 1+, le

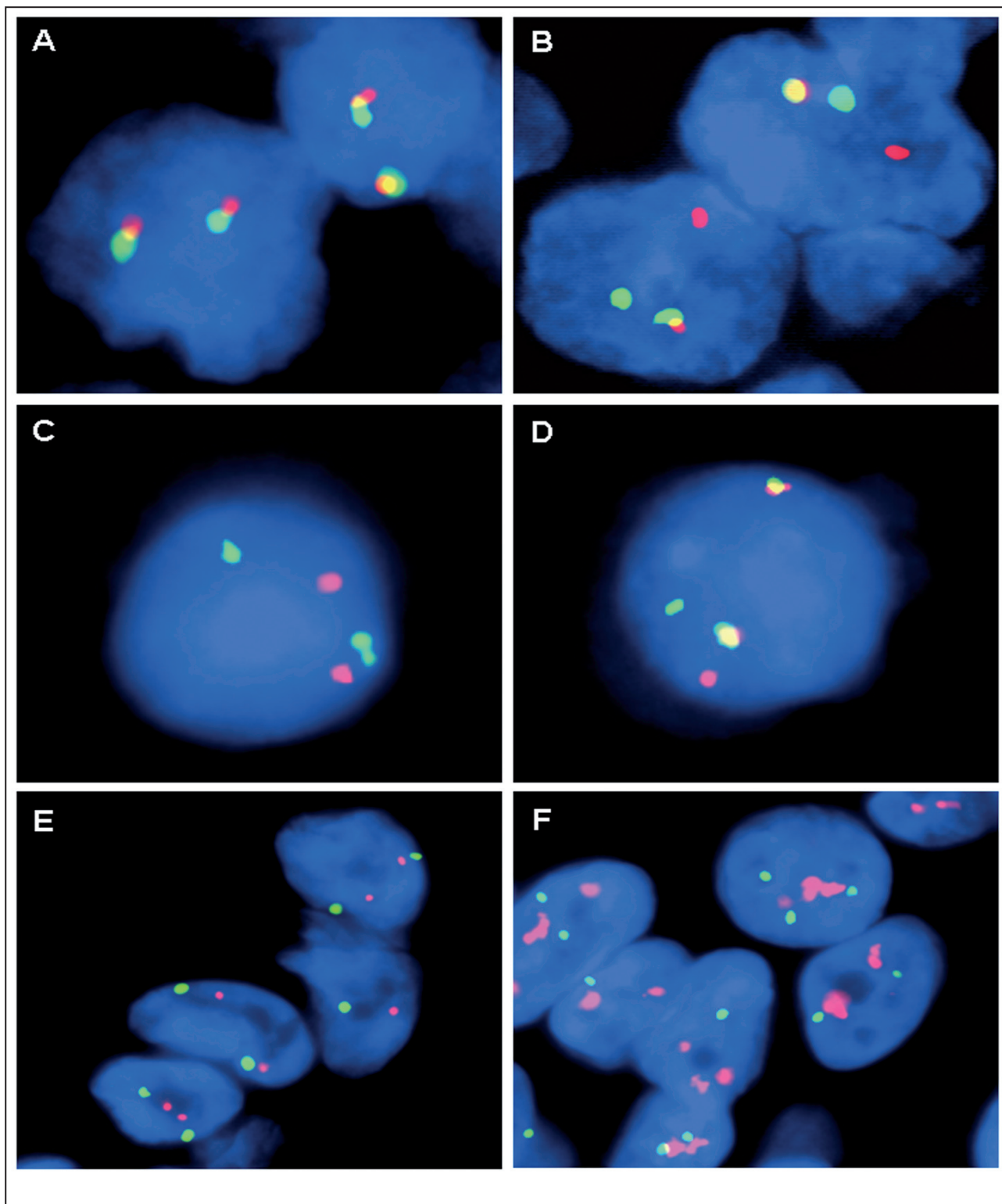


Figure 1. A-B) Sonde FISH de séparation (exemple illustré : *BCL6* FISH DNA Probe, Split Signal, Dako). Une sonde rouge et une sonde verte s'hybrident de part et d'autre du gène d'intérêt. Lorsque les deux sondes sont colocalisées, elles donnent lieu à un signal de fusion (jaune). Dans une cellule normale, on observe deux signaux de fusion (A, x1000). Dans une cellule qui comporte un réarrangement du gène étudié, les sondes se séparent donnant lieu à des signaux rouge et vert séparés, accompagnés d'un signal de fusion correspondant à l'allèle normal non réarrangé (B, x1000). C-D) Sonde FISH de double fusion (exemple illustré : *IGH/BCL2* Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe, Vysis). Un des gènes est reconnu par une sonde rouge tandis que l'autre gène est marqué par une sonde verte. Dans une cellule normale, avec deux allèles normaux pour chaque gène, on observe deux signaux rouges et deux signaux verts (C, x1000). Dans une cellule portant une translocation, les gènes impliqués sont réarrangés entre eux, donnant lieu à deux signaux de fusion (jaunes), associés à un signal rouge et un signal vert supplémentaires correspondant aux allèles normaux (D, x1000). E-F) Sonde FISH pour la recherche d'une amplification du gène *HER2* (exemple illustré : kit PathVysion, Vysis). Le nombre moyen de signaux rouges (sonde test ciblant le gène *HER2*) est rapporté au nombre moyen de signaux verts (sonde contrôle ciblant le centromère du chromosome 17, CEP17). Dans une cellule normale, les signaux rouges sont en nombre à peu près équivalents aux signaux verts (rapport *HER2*/CEP17 < 1,8), indiquant une absence d'amplification du gène *HER2* (E, x600). Dans une cellule porteuse d'une amplification de *HER2*, les signaux rouges sont augmentés en nombre (rapport *HER2*/CEP17 > 2,2) et souvent regroupés en grappes (F, x600).

test est considéré comme négatif et le traitement ciblant HER2 n'est pas indiqué. Lorsque le score immunohistologique est 2+ ou 3+, une FISH doit être réalisée pour démontrer une amplification du gène HER2. Les algorithmes dépendent ensuite du type de technique FISH utilisée. Pour la technique FISH réalisée au CHU de Liège, une sonde centromérique du chromosome 17 marquée avec un fluorochrome différent de la sonde HER2 est systématiquement associée pour démontrer une polysomie éventuelle. Le nombre moyen de signaux fluorescents pour le gène HER2 (sonde test en rouge) est comparé au nombre moyen de signaux fluorescents obtenus avec la sonde de contrôle (D17Z1, sonde contrôle en vert). Le rapport de fréquence HER2/sonde contrôle est effectué à partir de l'analyse de 20 noyaux situés dans 2 zones tumorales différentes. Si le rapport est inférieur à 1,8, le test est considéré comme négatif. Il n'y a pas d'amplification du gène HER2 (Fig. 1E). Si le rapport est supérieur à 2,2, le test est considéré comme positif. Ceci témoigne d'une amplification du gène HER2 (Fig. 1F). Si ce rapport se situe entre 1,8 et 2,2 le résultat est douteux, et le test doit être recommencé.

La participation à des programmes d'assurance de qualité externe est obligatoire pour l'obtention de l'accréditation de ce test. Différents organismes proposent des programmes d'assurance de qualité externe. Notre laboratoire a opté pour celui organisé par le Collège Américain des Pathologistes (www.cap.org).

CHIPS

PRINCIPES GÉNÉRAUX

Les chips les plus répandus sont les puces à ADN qui correspondent à un ensemble de molécules d'ADN fixées en rangées ordonnées sur une surface solide, comme une lame de verre. Ces molécules d'ADN fonctionnent comme des sondes pour analyser différents paramètres, comme le niveau d'expression ou de méthylation d'un grand nombre de gènes dans un tissu donné (par exemple, un cancer) par rapport à un échantillon de référence.

Avant l'avènement de cette technologie, diverses méthodes permettaient d'aborder l'étude de l'expression des gènes, telle que la technique de Northern blot ou de transcription inverse suivie de réactions de polymérisation en chaîne («Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction», RT-PCR). La principale avancée des puces à ADN a été de changer d'échelle,

avec l'analyse simultanée d'un grand nombre de transcrits d'un génome.

Pour une expérience donnée, une condition expérimentale (stress, pathologie, état de différenciation cellulaire, ...) est comparée à une condition de référence. Les ARN messagers sont extraits des deux types de cellules que l'on veut comparer. Les ARN messagers sont ensuite rétro-transcrits en ADN complémentaire par une transcriptase inverse. Au cours de cette rétro-transcription, les ADN complémentaires d'un type de cellules sont marqués par une molécule fluorescente (par exemple, verte) tandis que les ADN complémentaires de l'autre type de cellules sont marqués par une autre molécule fluorescente (par exemple, rouge). Les deux familles de cibles sont mélangées et déposées sur la lame. S'il existe un brin d'ADN sonde complémentaire d'un brin d'ADN cible, il s'hybride pour former de l'ADN double brin fluorescent. Cette hybridation est compétitive. Plus la concentration d'un ADN complémentaire cible (donc celle de l'ARN messenger qui en est l'origine) est élevée, plus l'ADN complémentaire cible s'hybridera sur la sonde. En conséquence, l'intensité de fluorescence verte ou rouge traduit l'hybridation préférentielle d'un ADN complémentaire cible de référence (témoin) ou d'un ADN complémentaire cible issu de la condition expérimentale. L'intensité de fluorescence traduit donc la concentration relative des ARN messagers dans chaque condition. Ceux-ci sont soit surexprimés, exprimés de la même manière ou sous-exprimés. Les étapes suivantes consistent à analyser les données à l'aide d'outils bioinformatiques et à corrélérer les résultats à des informations biologiques contenues dans différentes bases de données.

APPLICATIONS

La technique des chips, en permettant de connaître l'état d'activité des gènes d'une population cellulaire donnée, a trouvé des applications dans le diagnostic, le pronostic et l'orientation thérapeutique de nombreuses pathologies. Ainsi, l'identification des signatures moléculaires des cancers s'est révélée utile dans la classification de certains cancers. De plus, l'analyse du transcriptome a permis d'identifier de nouvelles classes dans des groupes de tumeurs que l'on pensait homogènes (lymphomes B diffus à grandes cellules), d'évaluer leur agressivité ou de déterminer la sensibilité des cancers à des thérapies (14).

Les puces à ADN permettent aussi d'identifier des délétions ou amplifications de régions

chromosomiques par hybridation génomique comparative (CGH) sur des puces couvrant la région à tester au moyen de sondes régulièrement réparties. Ce principe s'applique à l'analyse des points de polymorphisme (SNP) du génome. Pour chaque SNP, des oligonucléotides correspondant aux différents variants connus sont déposés sur une puce qui sera hybridée avec l'ADN d'un malade, par exemple.

Une autre application concernant les facteurs de transcription est la «Chromatin ImmunoPrecipitation» (ChIP)—chip. Il s'agit d'immunoprécipiter un facteur de transcription en même temps que les segments d'ADN sur lesquels il est fixé. Ces segments d'ADN sont ensuite caractérisés par hybridation sur une puce à ADN (chip).

A l'heure actuelle, de plus en plus d'études combinent plusieurs approches génomiques utilisant des puces à ADN. Il peut s'agir d'un génotypage CGH avec l'analyse du transcriptome afin de déterminer l'impact des amplifications ou des délétions géniques sur le transcriptome (intégration des données du transcriptome avec celles du ChIP—chip). Ces analyses ouvrent même la voie à la modélisation statique ou dynamique des systèmes biologiques, en analysant, par exemple, l'effet d'un médicament ou d'une mutation sur un système biologique donné. Une autre approche récemment développée vise à faciliter la découverte de gènes de susceptibilité dans des pathologies multifactorielles en couplant le génotypage SNP à l'analyse du transcriptome, ce qui permet de relier les polymorphismes génétiques directement à l'expression des gènes.

Enfin, une variante de la technique de chips, qui est particulièrement appréciée par les pathologistes, est le Tissue MicroArray que l'on désigne habituellement par les initiales «TMA». La technique consiste à construire, à partir de blocs de tissus inclus en paraffine ou congelés (blocs «donneurs»), de nouveaux blocs (blocs «receveurs») contenant plusieurs dizaines à plusieurs centaines de micro-cylindres (de 0,6 à 2 mm de diamètre) prélevés à partir des blocs «donneurs». A partir des blocs TMA, de nombreuses coupes peuvent être effectuées, sur lesquelles sont applicables les techniques morphologiques classiques, les examens immunohistologiques, voire les analyses de FISH. L'avantage de cette technique est donc évident. Elle permet de tester très rapidement plusieurs centaines de tissus pour la présence de biomarqueurs diagnostiques ou pronostiques, ainsi que des cibles thérapeutiques potentielles (15-18). En effet, le développement croissant de nouveaux agents thérapeutiques ciblant spécifiquement certains gènes ou certaines protéines nécessite, en corol-

laire, de disposer d'une méthode diagnostique permettant de définir l'altération de ces cibles au niveau des tumeurs individuelles, de façon à identifier les patients susceptibles de bénéficier de l'application du traitement. Préalablement à la sélection de potentielles cibles diagnostiques ou thérapeutiques, ces marqueurs doivent être validés à large échelle sur du matériel tumoral. Cette étape nécessite de recourir à des techniques d'hybridation *in situ* ou d'immunohistologie sur des biopsies de tissus tumoraux. La technologie de TMA permet d'accélérer considérablement les études *in situ* d'échantillons tissulaires. Plusieurs études ont validé la fiabilité de cette technologie en établissant la concordance des données générées par l'analyse des microéchantillons en comparaison des fragments biopsiques d'origine (16). De plus, la technique a l'avantage de préserver des échantillons tissulaires précieux puisque seulement des microcylindres sont prélevés à partir des blocs «donneurs». La possibilité de construire des micro-puces tissulaires constitue donc un outil essentiel pour faciliter et accélérer les applications cliniques des données générées par les recherches fondamentales.

BIBLIOGRAPHIE

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al.— WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press, 2008.
2. Ventura RA, Martin-Subero JI, Jones M et al.— FISH analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue. *J Mol Diagn*, 2006, **8**, 141-151.
3. Antonescu CR.— The role of genetic testing in soft tissue sarcoma. *Histopathology*, 2006, **48**, 13-21.
4. Bridge JA.— Contribution of cytogenetics to the management of poorly differentiated sarcomas. *Ultrastruct Pathol*, 2008, **32**, 63-71.
5. Downs-Kelly E, Goldblum JR, Patel RM, Weiss et al.— The utility of fluorescence in situ hybridization (FISH) in the diagnosis of myxoid soft tissue neoplasms. *Am J Surg Pathol*, 2008, **32**, 8-13.
6. Smith JS, Alderete B, Minn Y, et al.— Localization of common deletion regions on 1p and 19q in human gliomas and their association with histological subtype. *Oncogene*, 1999, **18**, 4144-4152.
7. Smith JS, Perry A, Borell TJ, et al.— Alterations of chromosome arms 1p and 19q as predictors of survival in oligodendrogliomas, astrocytomas, and mixed oligoastrocytomas. *J Clin Oncol*, 2000, **18**, 636-645.
8. Ino Y, Zlatescu MC, Sasaki H, et al.— Long survival and therapeutic responses in patients with histologically disparate high-grade gliomas demonstrating chromosome 1p loss. *J Neurosurg*, 2000, **92**, 983-990.
9. Burger PC.— What is an oligodendroglioma? *Brain Pathol*, 2002, **12**, 257-259.
10. Jenkins RB, Curran W, Scott CB, et al.— Pilot evaluation of 1p and 19q deletions in anaplastic oligodendrogliomas collected by a national cooperative cancer treatment group. *Am J Clin Oncol*, 2001, **24**, 506-508.

11. Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, et al.— Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst*, 1998, **90**, 1473-1479.
12. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al.— American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. *J Clin Oncol*, 2007, **25**, 118-145.
13. Colpaert C, Salgado R and the Belgian Working Party for Molecular Pathology.— Belgian guidelines for HER2/neu testing in breast cancer. *Bel J Med Oncol*, 2007, **1**, 22-29.
14. Turkheimer FE, Roncaroli F, Hennuy B et al.— Chromosomal patterns of gene expression from microarray data : methodology, validation and clinical relevance in gliomas. *BMC Bioinformatics*, 2006, **1**, 256.
15. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A et al. - Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*, 1998, **4**, 844-847.
16. Arafa M, Boniver J, Delvenne P.— Detection of HPV induced cervical (pre) neoplastic lesions: a tissue microarray (TMA) study. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2008, **16**, 422-432.
17. Arafa M, Kridelka F, Mathias V et al.— High frequency of RASSF1A and RARb2 gene promoter methylation in morphologically normal endometrium adjacent to endometrioid adenocarcinoma. *Histopathology*, 2008, **53**, 525-532.
18. Arafa M, Boniver J, Delvenne P.— Progression model tissue microarray (TMA) for the Study of Uterine Carcinomas. *Dis Markers*, 2010, **28**, 267-272.

Les demandes de tirés à part sont à adresser au
Pr Ph. Delvenne, Service d'Anatomie Pathologique,
CHU de Liège, 4000 Liège, Belgique.
E-mail: P.Delvenne@chu.ulg.ac.be